

氏名	たか はし のぶ ゆき 高 橋 延 行
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 678 号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科食品工学専攻
学位論文題目	STUDIES ON THE FOLDING PROCESSES OF EGG WHITE PROTEINS (卵白タンパク質の高次構造形成過程に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 土井悦四郎 教授 廣瀬正明 教授 外村辨一郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、タンパク質の高次構造形成過程を究明する目的で、従来、再生が不可能であるとされていた、S—S 結合を有する卵白タンパク質について、還元変性状態からの巻戻り・再酸化を試みた結果をとりまとめたものである。その主な内容は次の通りである。

1. 分子内 S—S 結合の形成、及び遊離 SH 基の反応性が、タンパク質の高次構造に依存することに着目し、巻戻り再生過程を分析する方法を検討した。変性状態からの再生過程では、SH 基/S—S 結合数の異なる分子種が生じ、従来から S—S 結合、遊離 SH 基の分析に用いられてきたアミノ酸分析法や、分光学的な手法では、その平均値としてしか分析できない。そこで化学修飾により遊離 SH 基の数に応じた電荷を有する試料を調製し（二段階アルキル化）、電気泳動における移動度の差により SH 基の個数を決定する方法を新たに開発した。電荷の異なるアルキル化剤（モノヨード酢酸、ヨードアセトアミド）を遊離 SH 基とそれ以外の SH 基に選択的に導入し、尿素ゲル電気泳動上で分離した。この方法を用いていくつかの S—S 結合を含むタンパク質（大豆トリブシンインヒビター、豚膵臓ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>、大腸菌チオレドキシン）について、そのハーフシスチンの数と S—S 結合の数を確認できた。本研究の対象である 2 種の卵白タンパク質（オボトランスフェリン、オボアルブミン）も、この方法で分析できることが分かったので、以下の巻戻り再生過程の解析に利用した。

2. 分子内に 15 個の S—S 結合を有する卵白タンパク質、オボトランスフェリンについて、還元変性状態からの有効な再生条件を検討した。まず、低分子量のタンパク質などに用いられてきた従来の一段階法による再生を試みた。還元変性状態のタンパク質を、酸化型と還元型のグルタチオンを含む緩衝液で希釈することにより再生を促し、前述の二段階アルキル化と電気泳動法により分析した結果、20 時間後でも全ての S—S 結合を再生するに至らないことが分かった。この方法では、誤った S—S 結合の形成と疎水性相互作用による不可逆的な重合が起こり、十分に再生されないと考えられた。そこで S—S 結合の形成を伴う重合を避けるために S—S 結合の再形成に先立って、低温下、還元状態で構造形成を促す二段階再生法

が有効であると考え、再生実験を行った。その結果、変性したオボトランスフェリンは、0°Cで還元的な緩衝液中、5分間のプレインキュベーションを経ることにより酸化型グルタチオン添加後3時間以内にS—S結合の再形成を完了することが分った。S—S結合を有するタンパク質の巻戻り再酸化において、還元状態で部分的に巻戻った状態を取らせることの重要性が明らかとなった。

3. 二段階再生法により、オボトランスフェリンの巻戻り再酸化が達成されることが分ったので、分子内に1個のS—S結合と4個のSH基を合わせ持つオボアルブミンについても、同様に変性状態からの再生を試みた。二段階再生法では再生中間体として部分的に巻戻った構造の分子が想定されるので、まず、このモデルとしてS—S結合を還元した分子を調製し、その高次構造を調べた。遠紫外部のCDスペクトルはS—S結合型と還元型の分子でほぼ一致していた。また、S—S結合型の分子にみられるトリプシンに対する抵抗性と、4個の遊離SH基に反応性がない特徴は、還元型の分子でも観察された。これらより、S—S結合還元型の分子は、ほぼnativeに近い構造を取っているものと考えられた。しかし、近紫外部のCDスペクトルは、両者で僅かの違いがあり、三次構造上の微細な変化の可能性が示唆された。蛍光性のアルキル化試薬に対して、S—S結合型は全く反応しなかったが、還元型の分子では2個のSH基が反応性となった。この反応性SH基の一次構造上の位置を調べたところ、native分子内では本来S—S結合を形成しているCys<sup>73</sup>とCys<sup>120</sup>が反応性となったことが分った。加えてズブチリシンによる加水分解に対しては、還元型の分子の感受性が高く、新たにCys<sup>73</sup>のN末端側で水解が起こった。これらの事実から、還元型オボアルブミンの全体の分子構造は、ほぼnative様で、僅かの変化はS—S結合の切断により生じたSH基の周辺に限られていることが明らかとなった。

実際に二段階法による再生過程を遠紫外CD測定、トリプシン抵抗性を指標として調べた結果、還元変性したオボアルブミンは還元状態で変性剤を希釈することにより、上記のモデルに相当するnative様の構造をとることが明らかになった。この再生中間体を酸化剤により再酸化させ、S—S結合の位置を調べたところ、native分子と同じCys<sup>73</sup>とCys<sup>120</sup>間のみには架橋が形成させることを確認した。

以上のように、複数の遊離SH基とS—S結合を有するタンパク質においても、還元状態での高次構造形成を経る二段階法を用いることにより正しいS—S結合を有する高次構造を再生することに成功した。

2種の卵白タンパク質の再生実験から、分子内にS—S結合を有する複雑なタンパク質の高次構造形成も、その一次構造情報のみによっており、その他の因子を必要としないことが証明された。

### 論文審査の結果の要旨

タンパク質の高次構造は、その一次構造(アミノ酸配列)により決定されるとされている。しかしながらS—S結合を有するタンパク質においては、S—S結合を完全に還元して変性した分子の、巻戻り再生は困難な場合が多く、補助的な因子、例えば disulfide isomerase の様な酵素の存在が必要であるとも考えられている。

本論文の著者は、S—S結合を有する複雑なタンパク質においても、その高次構造が一次構造上の情報のみにより形成し得ることを検証する目的で、卵白のタンパク質であるオボトランスフェリンと、オボアルブミンをモデルとして研究を行ったものであり、評価すべき主な点は次の通りである。

1. 還元、変性したタンパク質分子の巻戻り再生を研究するためには、還元されて遊離の状態にあるSH基から、S—S結合が生成する過程を正確に把握することが必要である。そこで著者は、化学修飾により、遊離SH基の数に応じた電荷を有する試料を調製し、電気泳動における移動度の差により、SH基の個数を決定する方法を開発した。これを用いていくつかのS—S結合を有するタンパク質について、そのハーフシスチンの数とS—S結合の数を確認した。本研究の対象であるオボトランスフェリン、オボアルブミンの巻戻り再生過程も、この方法により解析することができた。

2. 分子内に15個のS—S結合を有するオボトランスフェリンについて、還元変性状態からの有効な再生条件を検討した。まず、低分子量のタンパク質などに用いられてきた、従来の一段階法による再生を試みたが、全てのS—S結合を再生するに至らなかった。そこで、間違ったS—S結合の形成を伴う不可逆的な重合を避けるためにS—S結合の再形成に先立って、低温下還元状態で構造形成を促す、二段階再生法を考案して再生実験を行った。その結果、変性したオボトランスフェリンは、3時間以内にS—S結合の再形成を完了することが分った。

3. 分子内に1個のS—S結合と4個のSH基を合わせ持つオボアルブミンについても、同様に変性状態からの再生を試みた。二段階再生法では再生中間体として部分的に巻戻った構造の分子が想定されるので、まず、このモデルとしてS—S結合を還元した分子を調製し、その高次構造を種々の方法で調べた結果、S—S結合還元型の分子は、ほぼnativeに近い構造を取っているものと考えられたが、両者で僅かの違いがあり、その僅かの変化はS—S結合の切断により生じたSH基の周辺に限られていることを明らかにした。

実際に二段階法による再生過程を詳細に検討した結果、還元状態で変性剤を希釈することにより、上記のモデルに相当するnative様の構造をとることが明らかになった。この再生中間体を、酸化剤により再酸化させることにより、S—S結合が正しい位置に形成している高次構造の再生に成功した。

以上のように、本論文は分子内にS—S結合を有する複雑なタンパク質の高次構造も、その一次構造上の情報のみにより形成されることを証明したもので、タンパク質工学、生化学、食糧化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成3年2月25日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、農学博士の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。